

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Änderung der Proliferation von Knochenmarkkulturen unter Streptomycin und Penicillin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christel Dietsch
aus Zeulenroda

1971

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses

Berlin-Neukölln

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Änderung der Proliferation von Knochenmarkkulturen unter Streptomycin und Penicillin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christel Dietsch

aus Zeulenroda

ehem. Dekan: Professor Dr.med. Herbert L a x
Referent: Professor Dr.med. Irene B o l l
Korreferent: Professor Dr.med. Bernhard S c h m i d t

Gedruckt mit Genehmigung der ehem. Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 25. Januar 1971



Inhaltsübersicht

Einleitung	Seite 1
Fragestellung	Seite 7
Methode	Seite 8
Ergebnisse	Seite 19
Diskussion	Seite 35
Zusammenfassung	Seite 39
Literaturverzeichnis	Seite 40



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n l e i t u n g

Die zur Züchtung von Zellen und Geweben verwandten Nährmedien stellen ein wachstumsförderndes Prinzip dar, das auf alle Zellen gleichermaßen wirkt. Folglich besteht auch eine Beeinflussung von Bakterien und Pilzen, die meist eine noch wesentlich höhere Wachstumsrate aufweisen als die gezüchtete Zelle selbst, die ihrerseits durch Bakterientoxine geschädigt werden kann.

Es ist deshalb notwendig, Kulturen von tierischem oder menschlichem Gewebe keimfrei zu halten, was auf zwei Wegen erreicht wird :

1. Maßnahmen, die eine Verunreinigung schon sterilen Materials verhindert, z.B. Arbeiten in besonderen aseptischen Kultivationsräumen.
2. Maßnahmen, die zur Entfernung von Mikroorganismen führen aus allem Material, das mit dem Gewebe in Berührung kommen kann und aus dem Gewebe selbst.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Gewebe, Nährmedien, Apparaturen und Hilfsmaterial zu sterilisieren:

1. Abtötung von Bakterien und Pilzen auf physikalischem Wege, z.B. Bestrahlung mit UV - Licht oder Sterilisation durch trockene oder feuchte Hitze.
2. Rein mechanische Entfernung von Mikroorganismen durch Filtrieren, Zentrifugieren oder Waschen.

3. Chemische Zerstörung von Mikroorganismen durch Antiseptika und Antibiotika.

Die keimabtötende Wirkung der Antibiotika macht man sich in immer steigendem Maße bei der Kultivierung von Geweben und Zellen zunutze. Im angelsächsischen Schrifttum (PAUL, 1959) reicht die Skala der vorgeschlagenen Präparate von Penicillin und Streptomycin über Aureomycin, Bacitracin, Chloramphenicol, Endomycin ect. bis zum Viomycin. Die beinahe obligate Anwendung dieser Substanzen lassen eingedenk der verschiedenartigen nachgewiesenen pharmakologischen Nebenwirkungen einiger Antibiotika die Frage nach einer Beeinflussung der Zellaktivität in Gewebekulturen aufkommen.

Das mit Abstand am häufigsten verwendete Antibiotikum ist das Penicillin und in zweiter Linie das Streptomycin.

Nach PAUL (Cell and tissue culture, 1959) hat Penicillin - als Penicillin G (Na-Salz) - in der vorgeschlagenen Konzentration von 20 - 50 IE bzw. 30 µg/ml keinerlei schädigende Wirkung auf alle Typen von Zellen und führt in dieser Konzentration zu einer totalen Inaktivierung der Mehrzahl aller Bakterien. Penicillin-resistente Stämme können eliminiert werden durch Streptomycin in Konzentrationen bis zu 50 µg/ml und Pilzinfektionen durch Mykostatin bzw. Nystatin in Konzentrationen bis zu 20 µg/ml, wobei die zuletzt genannte Substanz, wenn möglich, auch durch Antibiotika in etwas höherer Dosierung ersetzt werden sollte, da ihre Wirkung mit der Zeit nachläßt (völlige Zerstörung nach 24^h bei 37° C) und zudem das Oxydationsprodukt toxisch ist.

Die Harmlosigkeit von Streptomycin und Penicillin bzw. anderer verwendeter Antibiotika hinsichtlich ihrer Wirkung auf Zellen und Gewebe beruht jedoch nicht auf einer prinzipiellen Unschädlichkeit, sondern ist in verschiedenem Maße abhängig von der vorliegenden Konzentration und der Beschaffenheit des jeweiligen Gewebes. So soll nach PAUL (1959) folgende Konzentration von Penicillin, Penicillin G und Streptomycin zu einer beginnenden Schädigung bzw. totalen Zerstörung von Gewebekulturen aus menschlicher Haut führen :

Schädigung:

Penicillin	1.000 μ g /ml	menschl. Haut
Penicillin G	600 μ g /ml	menschl. Haut
Streptomycin	1.000 μ g /ml	menschl. Haut
	1.000 μ g /ml	Hühnerherz

Zerstörung:

Penicillin	10.000 μ g /ml	menschl. Haut
Penicillin G	6.000 μ g /ml	menschl. Haut
Streptomycin	10.000 μ g /ml	menschl. Haut
	100.000 μ g /ml	Hühnerherz

RERABEK (1960) empfiehlt für den Zusatz zu Nährmedien ein Gemisch aus 100 - 500 IE Penicillin G und 100 - 500 μ g Streptomycin auf je 1 ml. Diese Mengen beider Antibiotika sollen ebenfalls wie Polymycin und Viomycin (METZGER u. Mitarb, 1952) für Kulturen unschädlich sein, dagegen Chloramphenicol und Aureomycin in Konzentrationen von 10 μ g /ml die Mitosen hemmen und Konzentrationen von 1000 μ g /ml völligen Wachstumsstillstand hervorrufen (LEPINE u. Mitarb. 1950).

Entsprechend der bekannten Tatsache, daß ein schädigendes Agens zuerst und besonders zu einer Irritation von hochdifferenzierten und damit empfindlichen Organstrukturen führt, wird man die Wirkung der Antibiotika - vor allem bei Anwendung von Mengen, die sich zwischen sicher un- schädlich und sicher schädlich bewegen - am besten an Reaktionen des Zellkernes bzw. der Chromosomen beobachten können.

Ein Maß für die Funktionstüchtigkeit des Zellkernes ist seine Fähigkeit zur Zellteilung - Mitose bzw. ein Maß für die Schädigung eines Gewebes die Änderung seines Mitoseindex. Das ist die Anzahl der Mitosen M einer gefundenen Anzahl teilungsfähiger Zellen N ausgedrückt in ‰.

$$MI = \frac{M \times 1000}{N} \text{ ‰}$$

NEU, ASPILLAGA u. GARDNER (1965) haben die Wirkung der Antibiotika auf menschliche Leukozyten untersucht und sind zu folgendem Ergebnis gekommen:

In Leukozytenkulturen aus menschlichem Blut (Gruppe O/RH) wurden Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol und Tetracyclin zugesetzt in steigenden Konzentrationen von 0, 50, 250, 500, 1000 bis 2000 µg/ml. Bei der Zellzählung wurden einmal gefundene Chromosomendefekte registriert und zum anderen die Änderung der Mitoseindices durch die zugesetzten Antibiotika in Abhängigkeit von deren Konzentration dargestellt.

Dabei fanden sich bei der Analyse der Metaphasen einige chromosomale Defekte, die aber durchaus innerhalb der normalen Rate von 2 - 5% lagen, allerdings keine Aufschlüsse über eventuelle Änderungen der Chromosomen im molekularen Bereich geben konnten.

Die Untersuchung der Mitoseindices jedoch ergaben recht deutliche Änderungen durch die einzelnen Antibiotika:

Tetracyclin führte zu einem Rückgang des Mitoseindex auf 0 schon bei Konzentrationen über $150 \mu\text{g} / \text{ml}$.

$50 \mu\text{g} / \text{ml}$ Penicillin und Streptomycin hatte eine Erniedrigung des Mitoseindex zur Folge ; bei $250 \mu\text{g} / \text{ml}$ und $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ konnte für Penicillin ein deutlicher Anstieg registriert werden und bei höheren Konzentrationen ein allmählicher Abfall auf geringe Werte.

Streptomycin führte nach leichtem Anstieg bei $250 \mu\text{g} / \text{ml}$ ebenfalls zu einem fast gleichmäßigen Abfall des Mitoseindex mit steigender Konzentration.

Von MOSKOWITZ (1963) wird eine unterschiedliche Wirkungsweise von Streptomycin und Dihydrostreptomycin diskutiert:

Es wird auf die Tatsache hingewiesen, daß Streptomycin bei hohen Konzentrationen zur Zerstörung von Brustdrüsenzellen führt, während für Dihydrostreptomycin, in der gleichen Dosis angewendet, kein toxischer Effekt nachgewiesen werden kann. Streptomycin wird die Fähigkeit zugeschrieben, sich mit Nukleinsäuren zu verbinden (COHEN, 1947). Nach MOSKOWITZ könnte die Verschiedenartigkeit der Wirkung einmal in der unterschiedlichen Beeinflussung von Zellbestandteilen, die Nukleinsäuren enthalten, begründet sein, aber auch nur Ausdruck differierender Membranpermeabilitäten für die zwei Substanzen sein. Die Klärung dieser Frage steht noch offen. Unabhängig von einer Begründung bedeutet die Feststellung der geringeren Toxizität von Dihydrostreptomycin gegenüber Streptomycin sinnvollerweise dessen Bevorzugung im Rahmen der Gewebezüchtung.

F r a g e s t e l l u n g

Diese Arbeit untersucht die Wirkung von Dihydrostreptomycin und Penicillin in bestimmten Konzentrationen auf die Proliferationsaktivität von Knochenmarkzellen, sowohl der Zellen der Granulopoese als auch der Erythropoese.

Unter Proliferationsaktivität wird definitionsgemäß verstanden die Änderung der Teilungsfähigkeit der Zelle - ausgedrückt im Mitoseindex - und die Änderung der Zellreifung, die sich darstellt als Verschiebung der prozentualen Verteilung der einzelnen Zellarten innerhalb der Reifungskurven.

Folgende Fragen liegen vor:

1. Besteht eine Änderung der Mitosehäufigkeit unter dem Einfluß von Dihydrostreptomycin und Penicillin ?
2. Läßt sich eine Wirkung der beiden Substanzen auf die Mitosephasenverteilung nachweisen ?
3. Ändern die verwendeten Zusätze die Zellreifung ?

M e t h o d e

Es werden Knochenmarkkulturen angelegt nach der Carrel'schen Technik, modifiziert von BOLL und FUCHS (1961):

1 Tropfen eines Gemisches aus 1 Teil Corrhormon, 4 Teilen Hank und 5 Teilen Eigenplasma wird mit der Pasteurpipette auf einen Objektträger gebracht und dient nach Gerinnung einem auf ihm sitzenden Bröckchen Sternalpunktat als Nährboden, dem außerdem 1 Tröpfchen Eigenserum zur Verhütung der Austrocknung beigegeben wird.

Der Objektträger wird abgedeckt mit einem Hohlschliffobjektträger, mit Paraffin abgedichtet und bei 37° C inkubiert.

Die Deckelaskulturen werden mit verschiedenen Zusätzen angelegt:

1. Kontrollkulturen ohne Zusatz
2. Kulturen mit 0,01% igen Zusatz
entsprechend 10 μ g /ml Dihydrostreptomycin
und 6 μ g /ml = 10 IE/ml Penicillin
3. Kulturen mit 0,1% igen Zusatz
entsprechend 100 μ g /ml Dihydrostreptomycin
und 60 μ g /ml = 100 IE/ml Penicillin
4. Kulturen mit 1% igen Zusatz
entsprechend 1.000 μ g /ml Dihydrostreptomycin
und 600 μ g /ml = 1.000 IE/ml Penicillin.

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden von allen Kulturen Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Unmittelbar nach der Sternalpunktion waren ebenfalls Ausstriche angefertigt worden.

Es wurden 75 Präparate auf je 1.000 Zellen ausgezählt, so daß insgesamt 75.000 Zellen der roten, weißen und lymphatischen Reihe differenziert wurden.

Ausgezählt wurden vorwiegend die aufgelockerten Randpartien der Präparate, die konsequent mäanderförmig durchgemustert wurden. Bei der Zählung wurden nur Zellen registriert, die eindeutig einer bestimmten Zellart zugeordnet werden konnten.

Die rote Reihe wurde differenziert in :

- Proerythroblasten
- basophile Erythroblasten
- polychromatische Erythroblasten
- oxyphile Erythroblasten
- reife Erythroblasten

Die weiße Reihe in :

- Myeloblasten
- Promyelocyten
- neutrophile Myelocyten
- eosinophile Myelocyten
- basophile Myelocyten
- Metamyelocyten
- starkkernige Granulocyten
- segmentkernige Granulocyten

eosinophile segmentkernige Granulocyten
basophile segmentkernige Granulocyten

Lymphoblasten

Lymphocyten

Monocyten

Lymphoide Retikulumzellen
phagocytierende Retikulumzellen

Plasmazellen

Die plättchenbildende Reihe in :

Megakaryoblasten

Megakaryocyten

Die morphologischen Kennzeichen der einzelnen Zelltypen sind folgende (Albrecht v. RIESEN 1957) :

Proerythroblast: Durchmesser 15 - 22 μ

Er besitzt einen großen runden Kern mit dichtem, feinkörnigem Chromatinnetz, der gleichmäßig von einem schmalen Cytoplasmasaum umgeben ist. Häufig ist eine perinukleäre Aufhellungszone. Das Protoplasma ist stark basophil.

Basophiler Erythroblast: Durchmesser 8 - 15 μ

Der Kern ist großschollig strukturiert. Bei den reiferen Formen ist bereits eine Radspeichenstruktur erkennbar. Die Kern - Plasma - Relation verschiebt sich zugunsten des Plasmas. Das immer noch basophile Protoplasma umgibt den Kern nicht mehr gleichmäßig breit, sondern ist oft zipfelig ausgezogen.

Polychromatischer Erythroblast:

Durchmesser 8 - 12 μ

Der Kern hat meist Radspeichenstruktur. Das Cytoplasma hat abhängig vom Hämoglobingehalt mit fortschreitender Reifung eine Färbung von grau-violett bis graurosa.

Oxyphiler Erythroblast:

Durchmesser 7 - 10 μ

Die Struktur des Kerns ist grobschollig und noch radiär angeordnet. Das Protoplasma, das stark mit Hämoglobin beladen ist, hat die Farbe der reifen Erythrocyten.

Reifer Erythroblast:

Durchmesser 7 - 10 μ

Das Hauptmerkmal des reifen Erythroblasten ist der völlig pyknotische Kern ohne Struktur. Die Farbe des Protoplasma kann variieren zwischen rein oxyphil und violett. Entscheidend für die Differenzierung ist der Verlust der Kernstruktur, der die Zelle als nicht mehr teilungsfähig ausweist.

Myeloblast:

Durchmesser um 16 μ

Er hat große Ähnlichkeit mit dem Proerythroblasten, seine Chromatinstruktur ist jedoch feinmaschiger und dichter und gibt dem Kern ein verwaschenes Aussehen. Der Kern ist meist oval und von einem schmalen hell-basophilen Cytoplasmasaum

umgeben. Häufig sind 2-3 Nucleoli sichtbar.
Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des
Kerns verschoben.

Promyelocyt:

Durchmesser 20 - 25 μ

Das Hauptkennzeichen des Promyelocyten ist seine grobe azarophile Granulation, die unregelmäßig über die ganze Zelle verteilt ist. Der Kern ist gegenüber den Myeloblasten von etwas gröberer Struktur, weist selten 1-2 Nucleoli auf und ist häufig gebuchtet. Der Protoplasmasaum ist etwas breiter und hat bereits eine grau-blaue Tönung, die mit steigender Reife zunimmt. Das Plasma ist in Kernnähe rötlich aufgehell.

Neutrophiler Myelocyt:

Durchmesser 14 - 18 μ

Er zeichnet sich aus durch einen ovalen oder auch nierenförmigen Kern mit einem dichten Chromatinnetz und oxyphilem Protoplasma mit feinkörnigen neutrophilen Granula. Nucleoli sind nicht mehr sichtbar.

Eosinophiler Myelocyt:

Durchmesser 14 - 18 μ

Der eosinophile Myelocyt ist leicht erkennbar an seiner plumpen eosinophilen Granula, die Kern und Plasma weitgehend überdecken.

Basophiler Myelocyt:

Durchmesser 14 - 18 μ

Das Aussehen entspricht dem eosinophilen Myelocyten, nur sind die Granula stark basophil und häufig noch grösscholliger als die eosinophilen.

Metamyelocyt:

Durchmesser 14 - 18 μ

Er entspricht in Plasmafärbung und Granulation dem Myelocyten, unterscheidet sich von ihm aber durch einen stärker eingebuchteten Kern.

Stabkerniger Granulocyt:

Durchmesser 14 - 18 μ

Als Kennzeichen der fortschreitenden Reifung hat er einen langgezogenen und hufeisenförmig gebogenen, bereits weitgehend pyknotischen Kern. Sein Protoplasma entspricht ebenfalls dem des Myelocyten.

Segmentkerniger Granulocyt:

Durchmesser 10 - 15 μ

Er weist im Unterschied zum stabkernigen Granulocyten einen Kern auf, der an 2 oder 3 Stellen fadenförmig eingeschnürt ist. Die Einschnürung beträgt an einer Stelle mindestens $\frac{2}{3}$ der Kerndicke. Meist entstehen 4 Segmente.

Eosinophiler segmentkerniger Granulocyt:

Durchmesser 10 - 15 μ

Ausgezeichnet durch seine bereits beim eosinophilen Granulocyten beschriebene Granula unterscheidet er sich vom normalen segmentkernigen Granulocyten durch die Unterteilung des Kerns in nur 2 Segmente, die durch einen kurzen Faden miteinander verbunden sind.

Basophiler segmentkerniger Granulocyt:

Durchmesser 10 - 15 μ

Er besitzt grobe basophile Granula, die einen zweisegmentierten Kern überdecken.

Lymphoblast:

Durchmesser 12 - 14 μ

Er ist dem Myeloblasten ähnlich, seine Kernstruktur ist jedoch weniger verwaschen. Der Plasmasaum ist schmal und ohne Granula. 1-2 Nucleoli kommen häufig vor.

Lymphocyt:

Durchmesser 9 - 12 μ

Der runde, ovale oder auch eingebuchtete Kern hat eine dunkle rot-violette Farbe und ist schollig strukturiert. Die Farbe des Protoplasma ist hellblau, enthält bisweilen feine azurophile Granula und umgibt den Kern manchmal nurmehr mit spärlichen Resten.

Monocyt:

Durchmesser 12 - 20 μ

Rauchblaues, fein granuliertes Protoplasma umgibt einen gelappten, nierenförmigen oder auch runden Kern mit lockerem Chromatingerüst.

Lymphoide Retikulumzelle:

Ihr wesentliches Merkmal ist ein zart hellblaues Plasma, das entweder peripher so undeutlich begrenzt ist, daß die Zellgröße nicht sicher zu bestimmen ist oder auch bereits beim Ausstrich vom Kern getrennt wurde, so daß die Kerne häufig nackt sind. Der Kern ist sehr groß, rund oder oval, locker strukturiert und hat meist 1 - 2 Nucleoli.

Phagocytierende Retikulumzelle:

Der der lymphoiden Retikulumzelle ähnliche Kern wird umgeben von hellblauem bis grauem Plasma, das verschiedenartige Einschlüsse enthält.

Plasmazelle:

Kleine, runde, excentrische liegende Kerne mit grober häufig radspeichenartiger Struktur werden von reichlich dunkelblauem bis violetter Protoplasma umgeben, das regelmäßig an einer Seite des Kerns aufgehellert ist und meistens deutliche Vakuolen enthält. Das Kern-Plasma-Verhältnis ist zugunsten des Cytoplasmas verschoben.

Megakaryoblast:

Durchmesser $\approx$ 20 μ

Er fällt auf durch seinen großen runden Kern mit unscharfer Chromatinstruktur. Das Protoplasma, das keine Granula enthält, ist tiefblau. Das Kern-Plasma-Verhältnis ist zugunsten des Kernes verschoben.

Megakaryocyt:

Durchmesser ca. 100 μ

Der Kern ist groß, meist gelappt, das Chromatingerüst dicht und ungeordnet. Violette: Protoplasma mit feiner Granula umgibt den Kern in unterschiedlicher flächenhafter Ausdehnung.

Die Differenzierung der Mitosephasen erfolgte nach folgenden Kriterien (BOLL 1958) :

1. Prophase:

Die Kernmembran hat sich aufgelöst, die Kernsubstanz ist aufgelockert. Ein Nucleolus ist nicht mehr vorhanden. Es besteht ein festes Spirem.

2. Frühe Metaphase:

Die Chromosomen sind über die ganze Zelle verteilt. Das feste Spirem ist zum lockeren Spirem geworden.

3. Späte Metaphase:

Anordnung der gut sichtbaren Chromosomen in der Äquatorialplatte bzw. im Monaster.

4. Anaphase:

Die Chromosomenplatten sind getrennt sichtbar. Es entsteht ein Diaster.

5. Telophase:

Auflockerung der Chromosomensätze, die sich zum Dispirem angeordnet haben. Das Protoplasma zeigt eine deutliche Einschnürung.

6. Rekonstruktionsphase:

Ausbildung eines festen Dispirem. Die Tochterzellen stehen höchstens noch über einen schmalen Protoplasmafaden miteinander in Verbindung. Eine deutliche Kernmembran ist noch nicht vorhanden, ebenso keine Nucleolen.

Als teilungsfähig wurden folgende Zellarten angesehen (ROHR 1960):

Proerythroblasten
Basophile Erythroblasten
Polychromatische Erythroblasten

Myeloblasten
Promyelocyten
Myelocyten
Metamyelocyten

Lymphoblasten
Lymphoide Retikulumzellen
Plasmoblasten
Megakaryoblasten

Für die Versuchsreihen wurden Knochenmarkkulturen von 8 verschiedenen Patienten mit unterschiedlicher klinischer Diagnose angelegt.

Es wurden 1. die Mitoseindices im Abstand von 24^h gezählt,

2. Reifungskurven der Kulturen bis 72^h aufgestellt,

3. die Verteilung der Mitosephasen grafisch dargestellt.

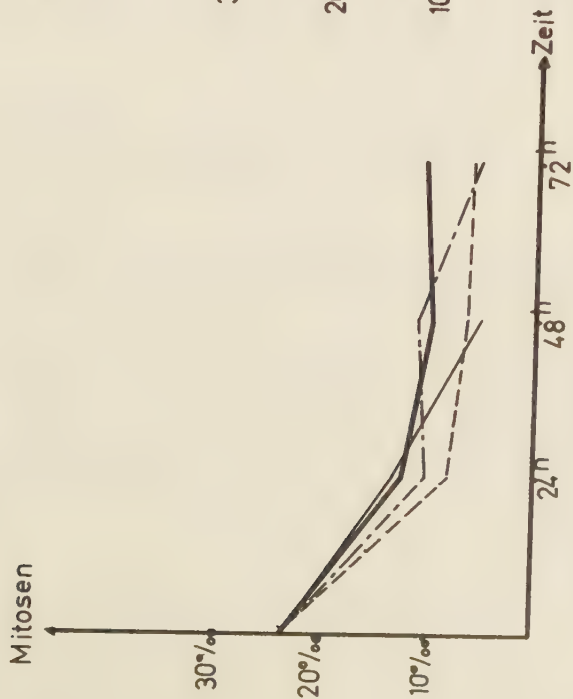
Ergebnisse

1. Die Mittelwerte der Mitoseindices aller Kulturansätze wurden in Abhängigkeit von der Zeit der Inkubation getrennt für die verschiedenen Kulturen jeweils für die weiße und rote Reihe dargestellt (Abb. 1).

Fast alle Mitoseindices bei den Kulturen mit Zusatz sind gegenüber den Kontrollkulturen erniedrigt.

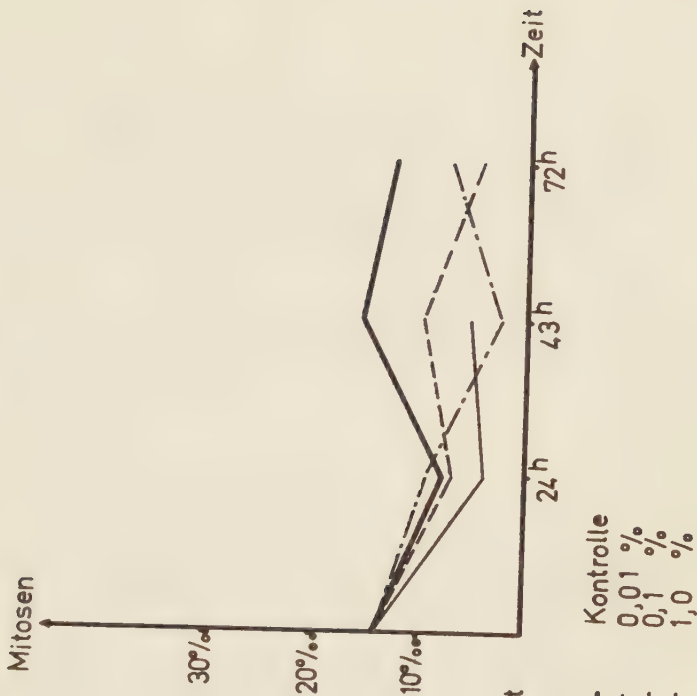
Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht, wie exakte statistische Berechnungen ergeben. Die Berechnung auf Signifikanz wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse durchgeführt. Die Verhältnisse für die Mitoseindices der Kulturen mit 1 %-igem Zusatz konnten nicht dargestellt werden, da hier insgesamt zu wenig Ausstriche gezählt wurden. In die Statistik gingen sämtliche gefundenen Einzelwerte ein. Die vorgegebene statistische Sicherheit beträgt 95 %.

weiße Reihe



Mitoseindex bei verschiedenen
Konzentrationen in Abhängigkeit
von der Zeit

rote Reihe



Kontrolle
0,01 %
0,1 %
1,0 %

Mittlerer Mitoseindex weiße Reihe (Ist-Werte):

Zeit

der Inkubation Kontrollkultur 0,01%iger Zus. 0,1%iger Zus. 1%iger Zus.

0 ^h	33,4 ⁰ /oo			
24 ^h	12,5 ⁰ /oo	8,4 ⁰ /oo	10,4 ⁰ /oo	13,6 ⁰ /oo
48 ^h	9,9 ⁰ /oo	6,7 ⁰ /oo	11,3 ⁰ /oo	5,3 ⁰ /oo
72 ^h	10,7 ⁰ /oo	6,3 ⁰ /oo	5,5 ⁰ /oo	entfällt

Mittlerer Mitoseindex rote Reihe (Ist-Werte):

Zeit

der Inkubation Kontrollkultur 0,01iger Zus. 0,1%iger Zus. 1%iger Zus.

0 ^h	14,1 ⁰ /oo			
24 ^h	7,9 ⁰ /oo	7,4 ⁰ /oo	9,5 ⁰ /oo	4,1 ⁰ /oo
48 ^h	15,8 ⁰ /oo	10,3 ⁰ /oo	2,5 ⁰ /oo	5,6 ⁰ /oo
72 ^h	12,8 ⁰ /oo	2,4 ⁰ /oo	7,6 ⁰ /oo	entfällt

Mitoseindex weiße Reihe:

Zeit der Inkubation	F	Fv	zm
24 ^h	3,94	1,97	zufällig
48 ^h	4,46	2,07	zufällig
72 ^h	19,33	5,85	zufällig

Mitoseindex rote Reihe:

Zeit der Inkubation	F	Fv	zm
24 ^h	19,39	18,91	zufällig
48 ^h	4,46	3,72	zufällig
72 ^h	4,76	1,91	zufällig

F = geforderter Grenzwert

Fv = gefundener Wert

zm = Unterschied zwischen den Konzentrationen

zm = signifikant, wenn $F < Fv$

Die Unterschiede der Mitoseindices sind somit weder in der Granulopoese noch in der Erythropoese signifikant.

Bei der grafischen Darstellung wurden die Mittelwerte aus den bei den verschiedenen Personen gefundenen Einzelwerten verwendet. Die dadurch entstehende Ungenauigkeit wurde bei der statistischen Berechnung ausgeschlossen.

2. Es wurden die Ausstriche in der angegebenen Weise ausgezählt und getrennt für jede Versuchsperson die Ergebnisse in Reifungskurven graphisch dargestellt. Die Zellzahlen wurden in Prozent angegeben und in Abhängigkeit von der Zeit der Bebrütung dargestellt.

Die Kulturen mit Zusatz wurden jeweils zu den Kontrollkulturen in Beziehung gesetzt. Zur Demonstration wurden aus allen vorliegenden Darstellungen je Zusatz zwei typische Fälle ausgewählt (Abb. 2 - 7).

Bei der Durchsicht der Reifungskurven fallen zum Teil erhebliche Abweichungen der einzelnen Kurvenscharen auf. Eine gemeinsame Tendenz läßt sich nicht erkennen.

Um das Verhalten der einzelnen Zelltypen deutlicher zu machen, wurden - getrennt für die wichtigsten Zellarten - Kurven zusammengefaßt aus allen Fällen angefertigt. Dabei erscheint die absolute Zellzahl als Mittelwert und wird wiederum in Abhängigkeit zur Zeit der Bebrütung dargestellt (Abb. 8 - 19).

Für jede dieser Zellarten wurde mit Hilfe des Mittelwertvergleichs die Signifikanz der Abweichung errechnet. Die vorgelegte statistische Sicherheit beträgt 95%.

Eine Berechnung der Verhältnisse für die Kulturen mit 1%igem Zusatz konnte nicht durchgeführt werden, da insgesamt zu wenig Ausstriche verwertbar waren.

Zeichenerklärung Abb. 2 - 7

Abszisse: Zellzahlen in Prozent

Ordinate: Zeit der Bebrütung

- 1 Proerythroblasten
- 2 basophile Erythroblasten
- 3 polychromatische Erythroblasten
- 4 reife Erythroblasten
- 5 retikuläre Retikulumzellen
- 6 lymphatische Retikulumzellen
- 7 Plasmazellen
- 8 Lymphocyten
- 9 Monocyten
- 10 Myeloblasten
- 11 Promyelocyten
- 12 neutrophile Myelocyten
- 13 eosinophile Myelocyten
- 14 basophile Myelocyten
- 15 Metamyelocyten
- 16 stabkernige Granulocyten
- 17 segmentkernige Granulocyten
- 18 eosinophile segmentkernige Granulocyten
- 19 Megakaryocyten

Abb. 2

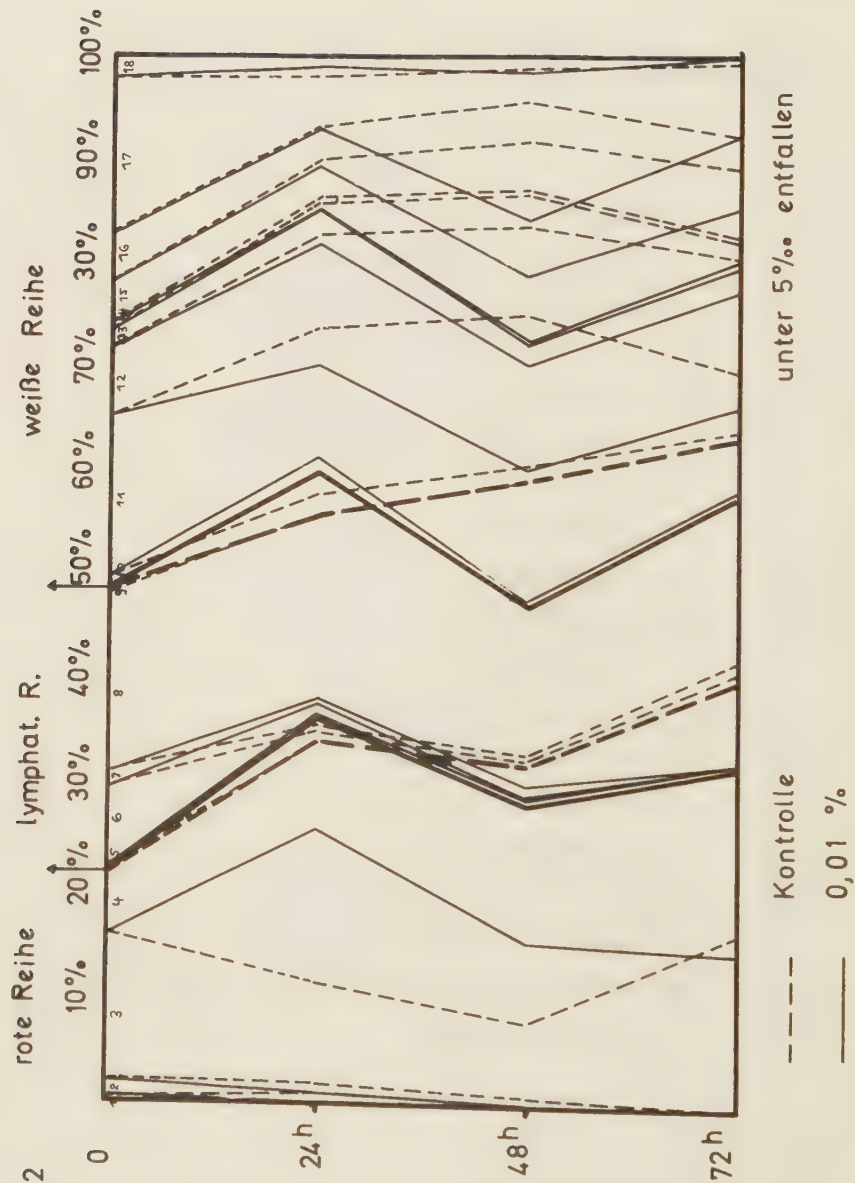


Abb. 3

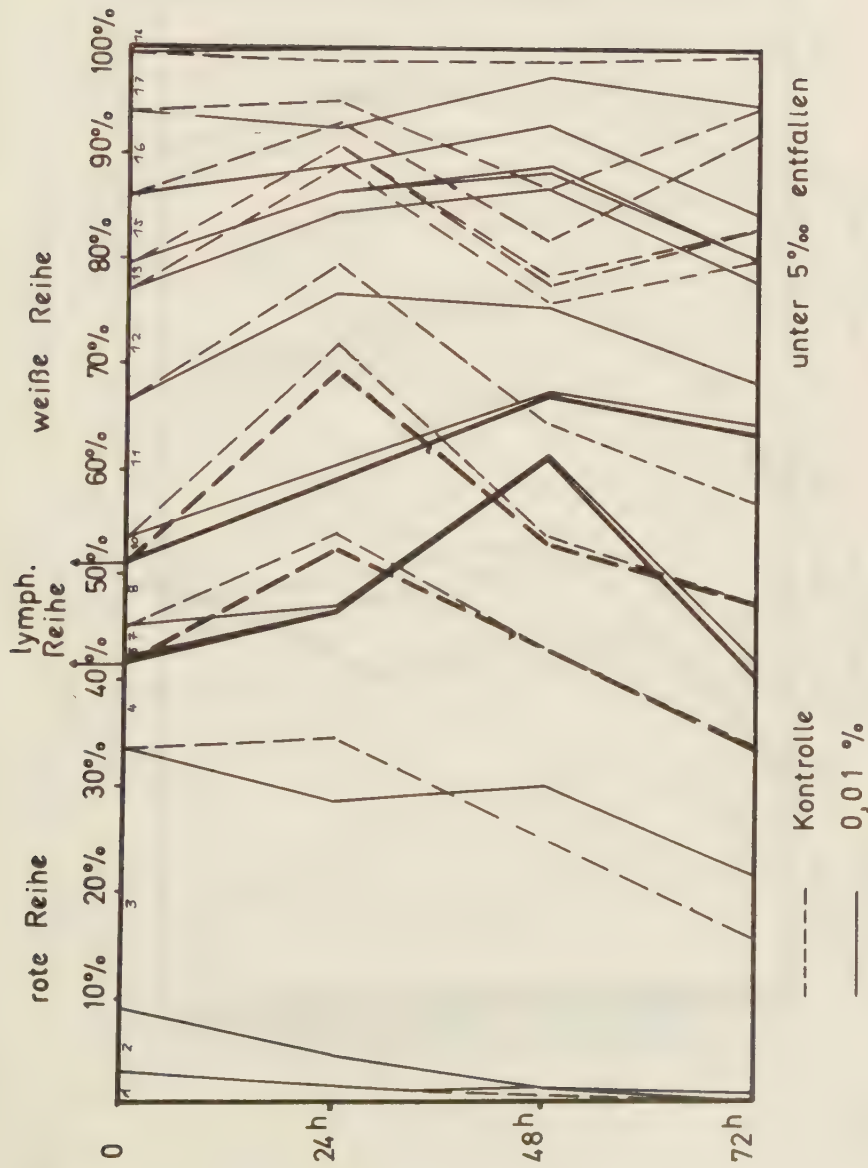


Abb. 4

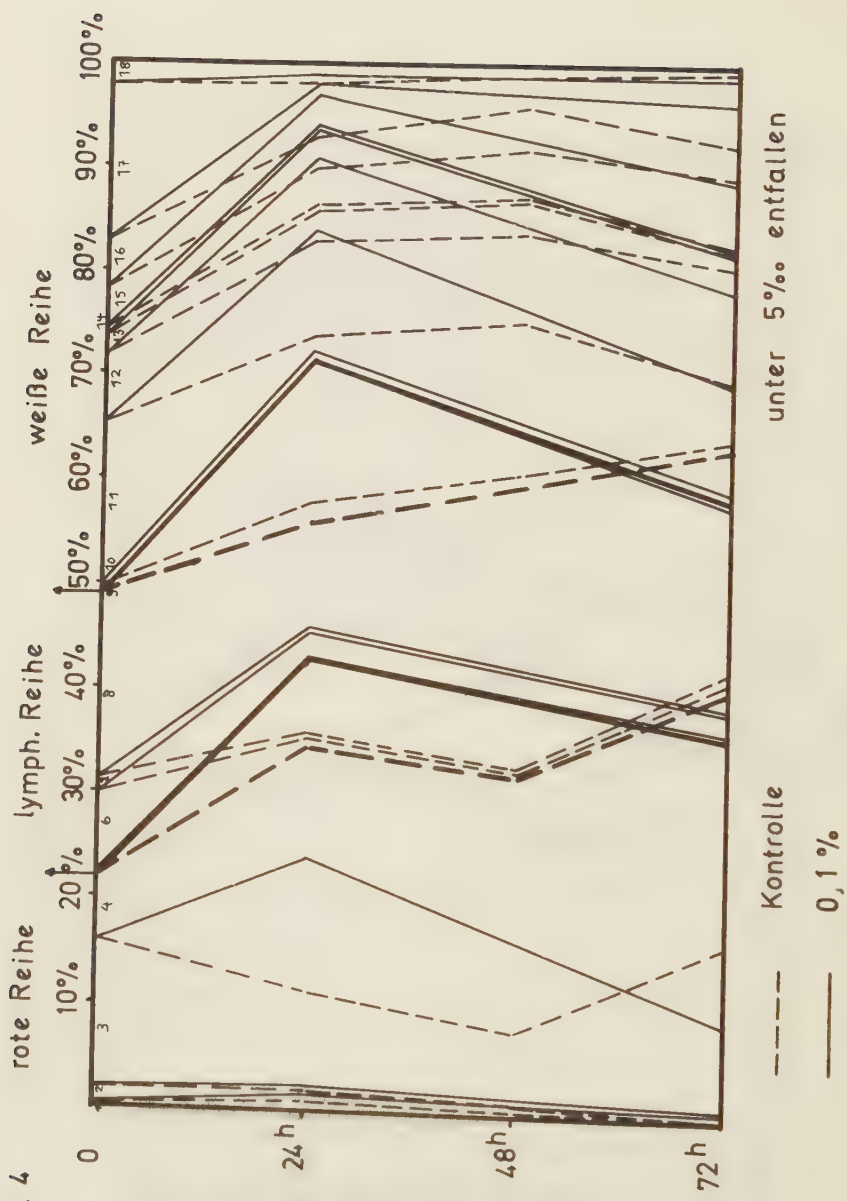


Abb. 5

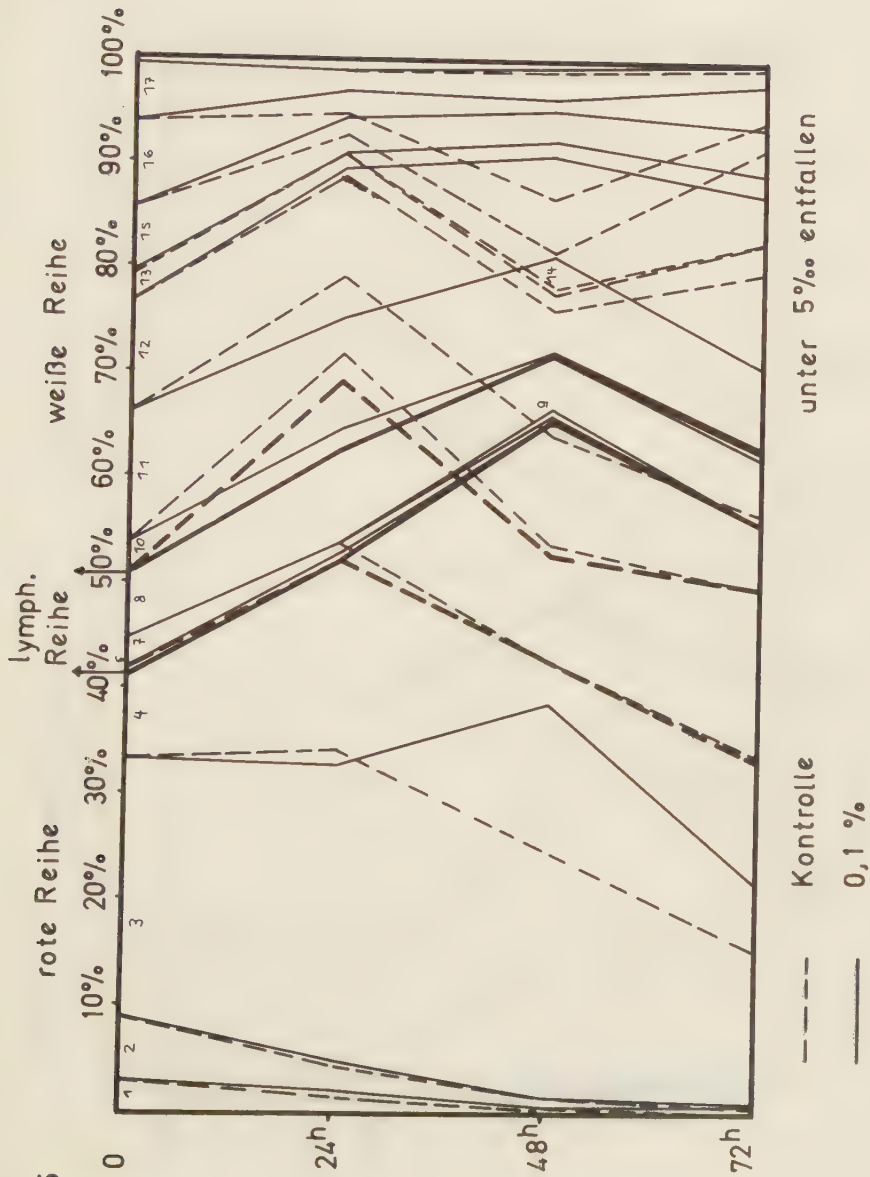


Abb. 6

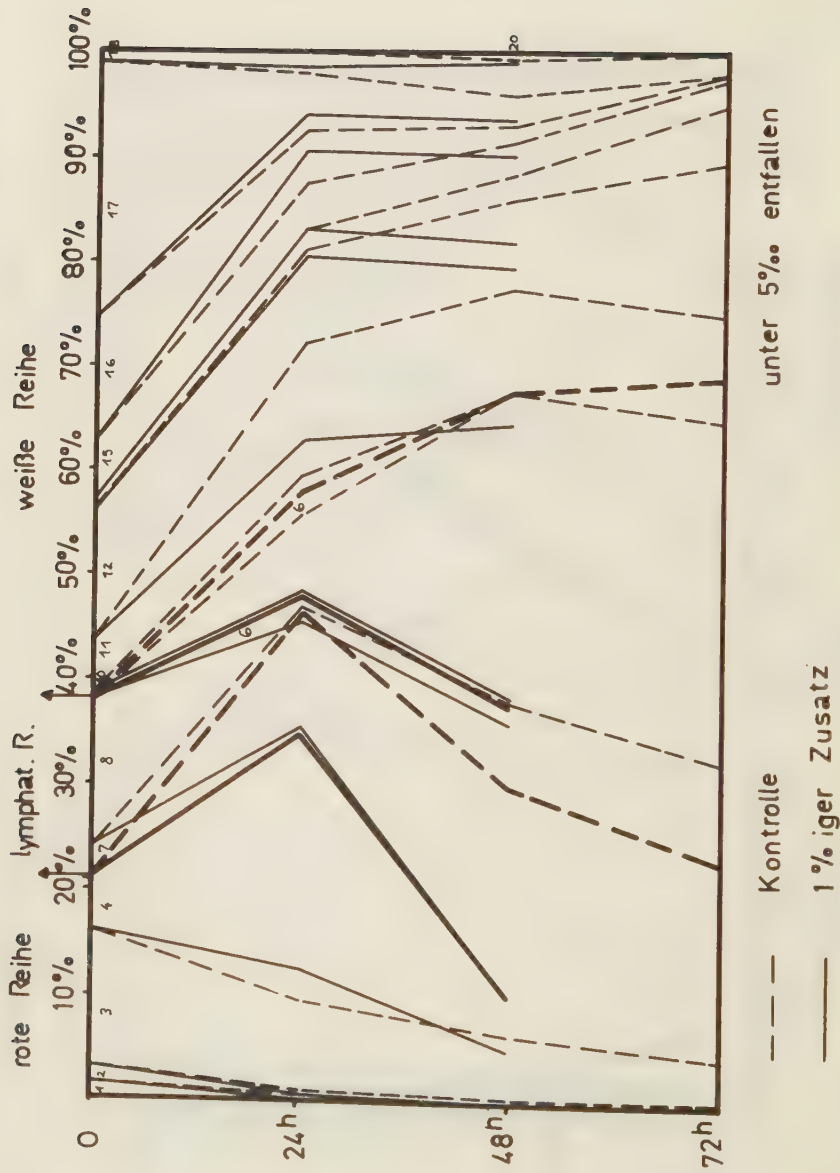
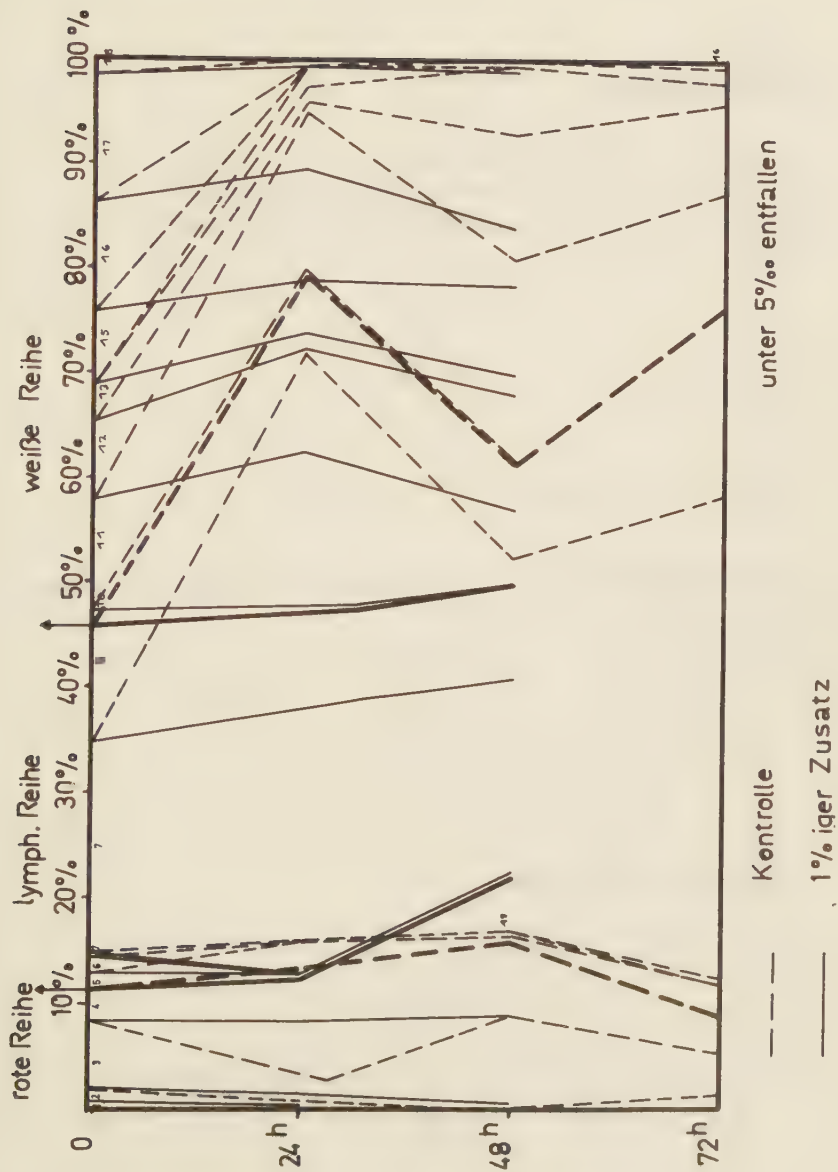


Abb. 7



1. Proerythroblasten: (Abb. 5)

Die Kurven liegen dicht beieinander. Die Änderungen sind sowohl bei 24^h als auch bei 48^h und 72^h gering. Nach der Varianzanalyse ergibt sich keine signifikante Abweichung.

$$F_v = 2,23 \qquad F = 6,94$$

$$F_v < F$$

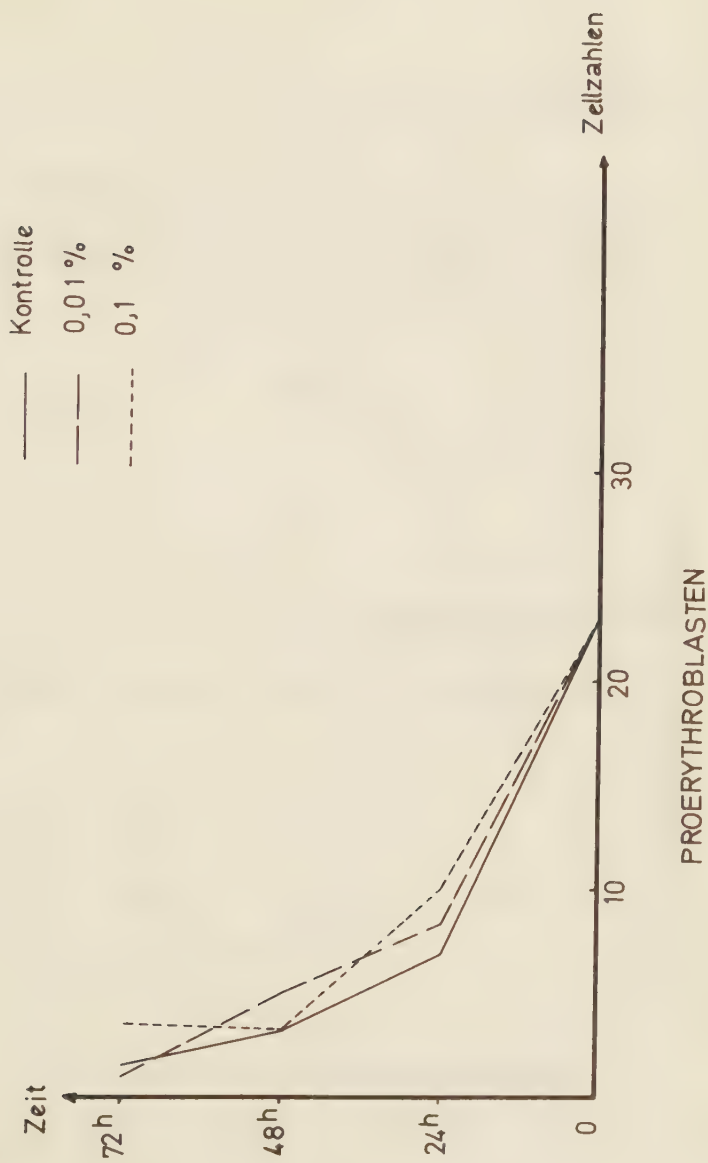
$$z_m = \text{zufällig}$$

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	23,0				
24 ^h	6,9	8,3	10,0	1,5	
48 ^h	5,2	5,0	3,3	1,0	
72 ^h	1,5	2,0	3,5	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 8



2. Basophile Erythroblasten: (Abb. 9)

Neben der gemeinsamen Abnahme der Zellzahl im Laufe der Bebrütung, lassen sich größere Abweichungen der Kulturen mit Zusatz von den Kontrollkulturen feststellen, die jedoch nicht signifikant sind.

$$F_v = 1,46$$

$$F = 19,25$$

$$F_v < F$$

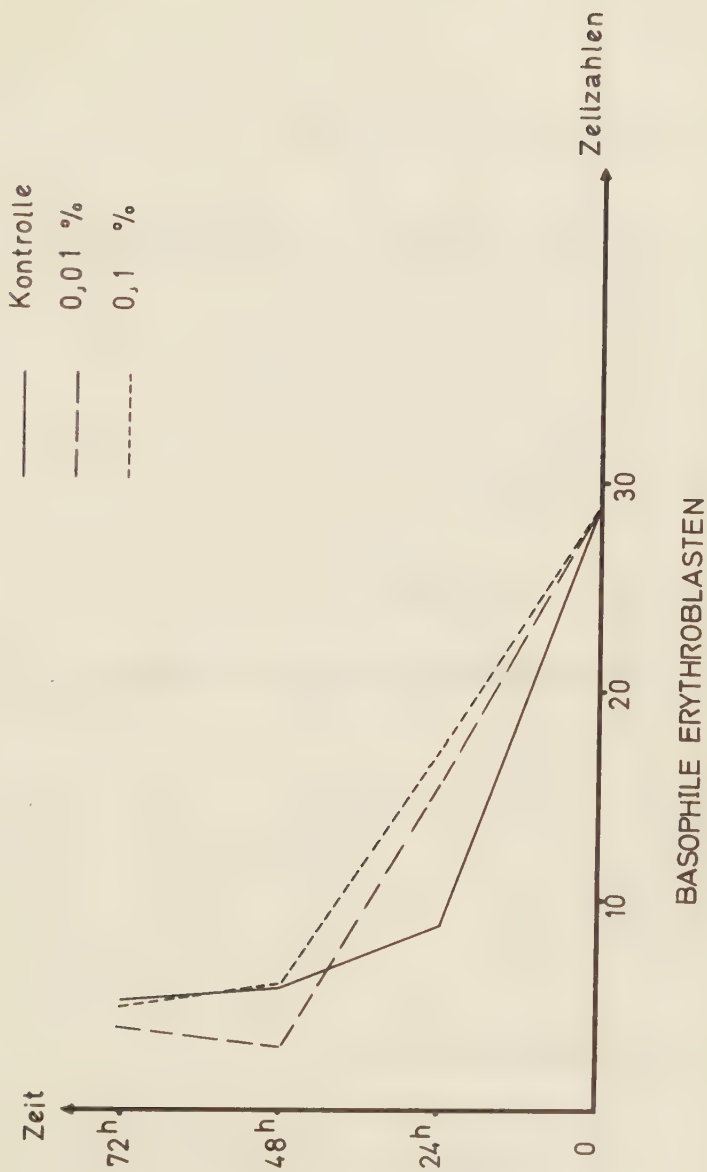
$$z_m = \text{zufällig}$$

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	29,0				
24 ^h	0,0	15,7	17,4	6,5	
48 ^h	5,0	3,0	6,0	2,0	
72 ^h	5,2	3,0	4,8	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 9



3. Polychromatische Erythroblasten: (Abb. 10)

Die Kurven weichen bei 24^h und 48^h erheblich auseinander und gleichen sich nach weiterer Bebrütungszeit wieder an.

Die Abweichungen sind nicht signifikant.

$$F_v = 2,98 \quad F = 6,94$$

$$F_v \ll F$$

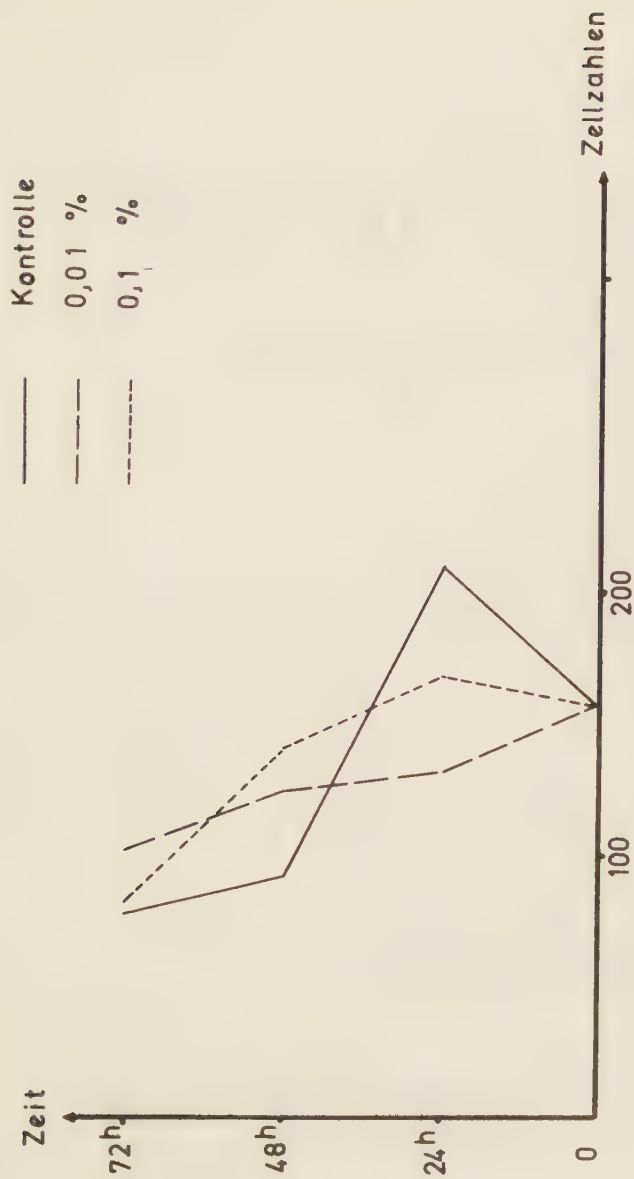
$$z_m = \text{zufällig}$$

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	156,6				
24 ^h	209,4	131,9	167,5	95,0	
48 ^h	91,5	124,5	140,6	68,5	
72 ^h	77,4	101,7	82,0	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 10



POLYCHROMATISCHE ERYTHROBLASTEN

4. Reife Erythroblasten: (Abb. 11)

Es besteht eine allgemeine Zunahme der Zellzahlen bis 48h. Die Kurve für 0,1 % Zusatz fällt erheblich aus dem Gesamtbild heraus.

Die Abweichungen sind nicht signifikant.

$$F_v = 3,09 \quad F = 6,94$$

$$F_v < F$$

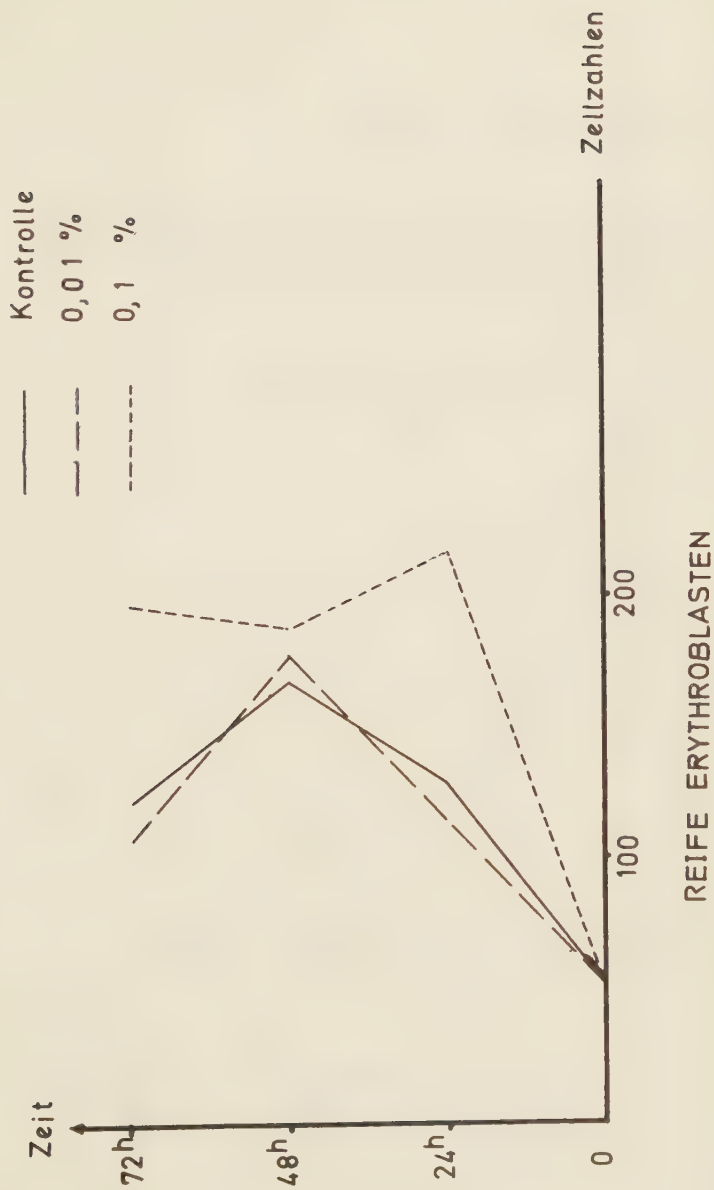
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	52,3				
24 ^h	126,8	114,7	217,8	133,0	
48 ^h	167,6	176,8	187,8	90,0	
72 ^h	122,3	107,3	196,4	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 11



5. Myeloblasten:

(Abb. 12)

Die Kurven für die beiden Kulturansätze verhalten sich gleichsinnig. Eine auffällige Differenz besteht bei 48^h zu den Werten der Kontrollkultur.

Die Abweichungen sind nicht signifikant.

$$F_v = 3,28$$

$$F = 19,25$$

$$F_v < F$$

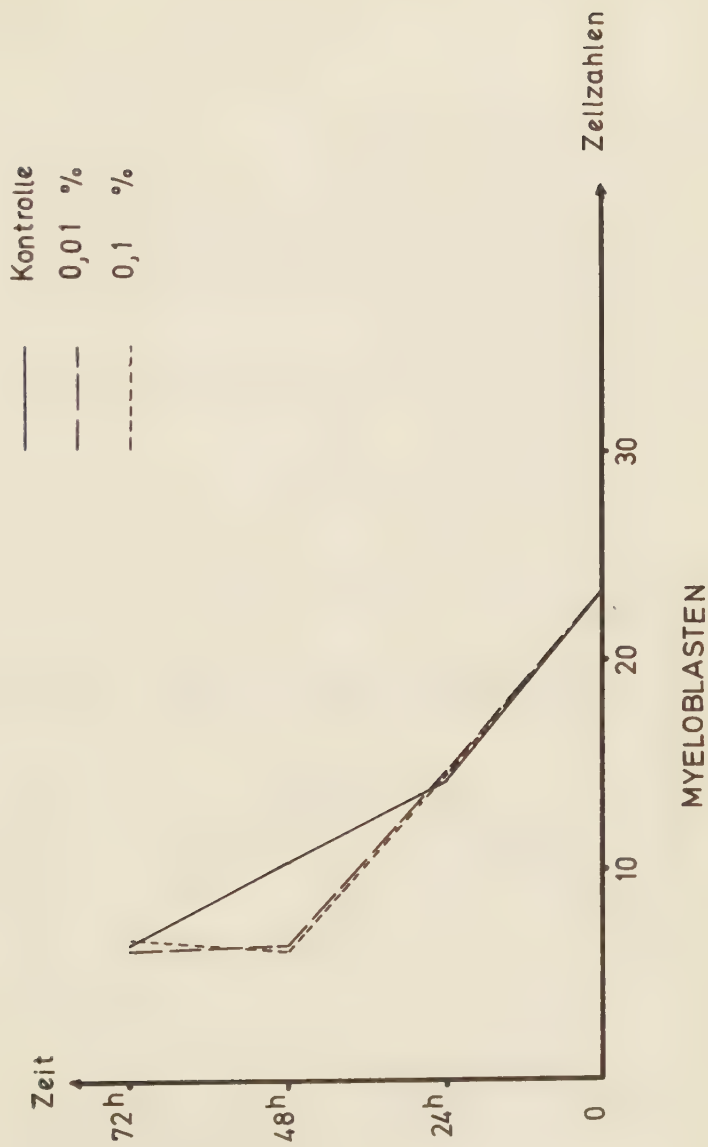
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1,0 %	*
0 ^h	23,3				
24 ^h	14,3	17,2	14,7	4,0	
48 ^h	10,5	6,5	6,2	10,0	
72 ^h	6,5	6,2	6,8	-	

* wenig auswertbares Material

Abb. 12



G. Fremyeloeyten: (Abb. 13)

Die Werte für die Kulturen mit 0,01%igem Zusatz verhalten sich ähnlich den Kontrollkulturen. Bei 72^h wird eine erhebliche Abweichung der Kurve für 0,1% Supracillin gefunden.

Insgesamt werden die Abweichungen als nicht signifikant bezeichnet.

$$F_v = 5,10 \quad F = 19,25$$

$$F_v < F$$

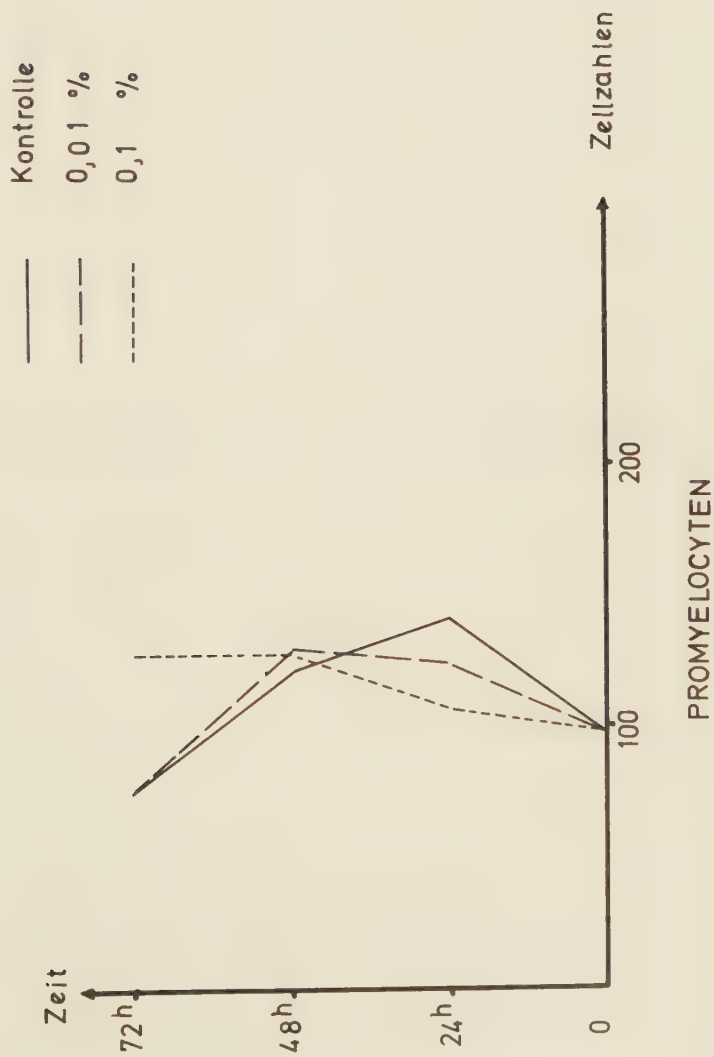
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	90,1				
24 ^h	144,3	124,3	107,5	145,5	
40 ^h	121,0	129,0	129,2	167,0	
72 ^h	75,9	76,3	123,0	-	

* wenig auswertbares Material

Abb. 13



7. Myelocyten: (Tab. 14)

Alle Kurven verhalten sich ähnlich.

Die Abweichungen sind nicht signifikant.

$$F_v = 2,91 \quad F = 6,94$$

$$F_v < F$$

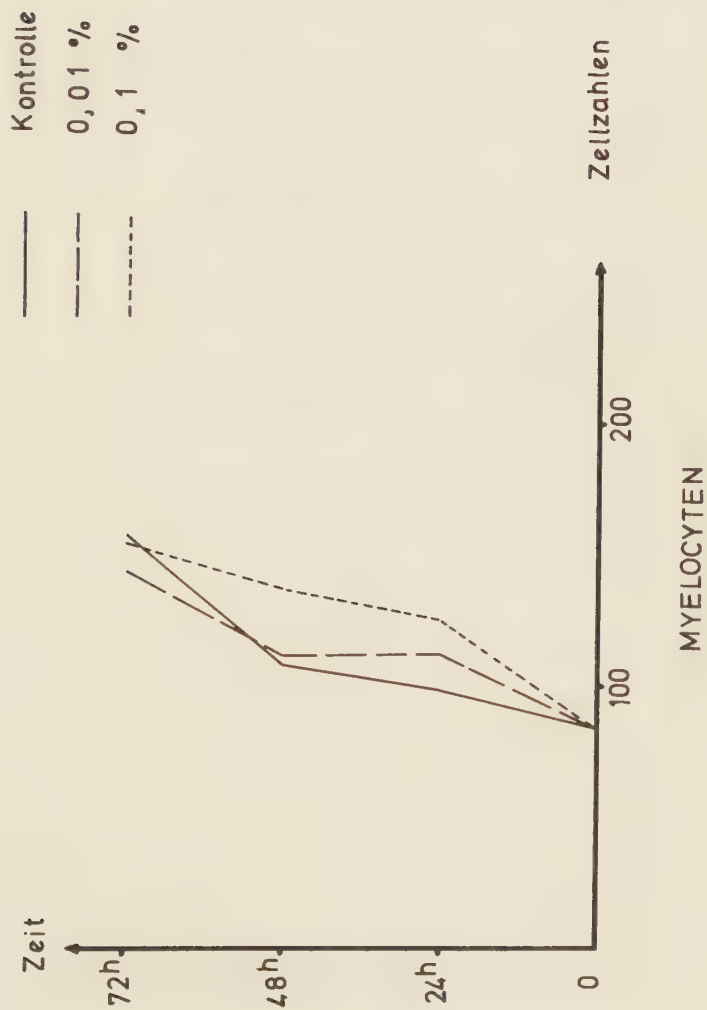
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte):

Kontrollkulturen		0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	84,4				
24 ^h	98,9	112,4	124,8	138,0	
48 ^h	107,9	111,5	137,2	130,0	
72 ^h	157,9	143,4	154,6	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 14



8. Metamyelocyten: (Abb. 15)

Die Kurven entfernen sich bis 48^h erheblich voneinander. Die Differenzen nehmen bei weiterer Bebrütung wieder ab.

Die Abweichungen sind nicht signifikant.

$$F_v = 1,31$$

$$F = 6,94$$

$$F_v < F$$

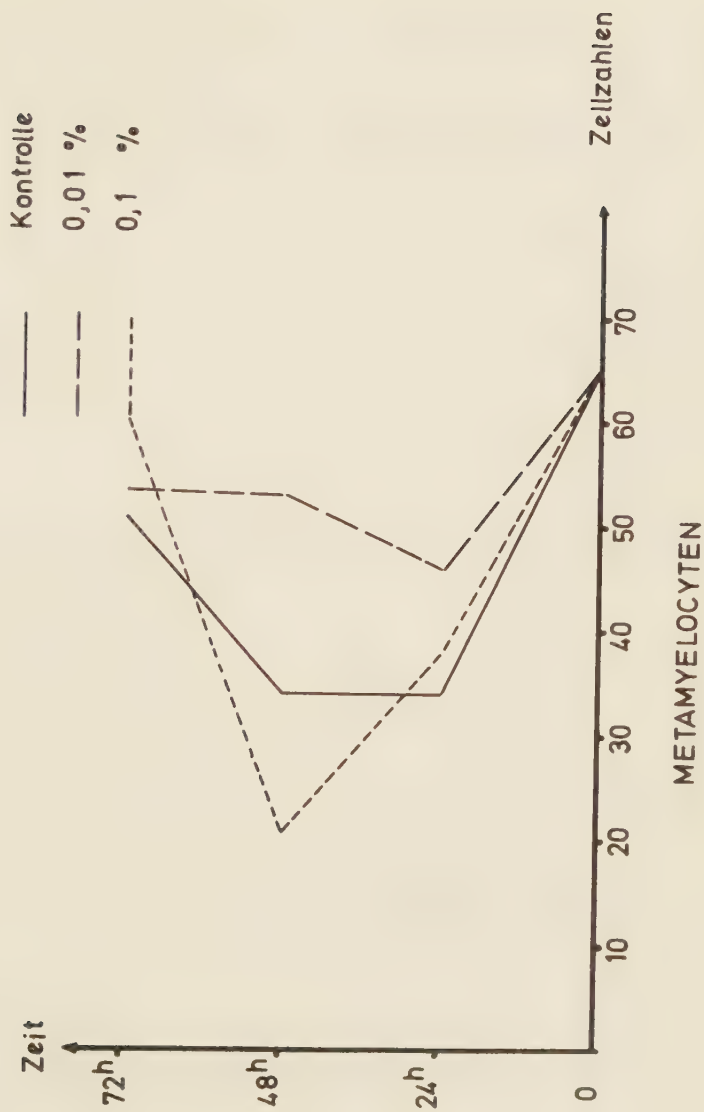
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	65,0				
24 ^h	33,9	46,0	37,8	62,0	
48 ^h	34,0	53,0	20,3	34,0	
72 ^h	50,9	53,4	59,8	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 15



9. Stabkernige Granulocyten:

(Abb. 16)

Bis 24^h verlaufen alle 3 Kurven dicht beieinander, um mit weiterer Bebrütungsdauer auseinanderzuweichen.

Die Abweichungen sind nicht signifikant.

$$F_v = 1,10$$

$$F = 6,94$$

$$F_v < F$$

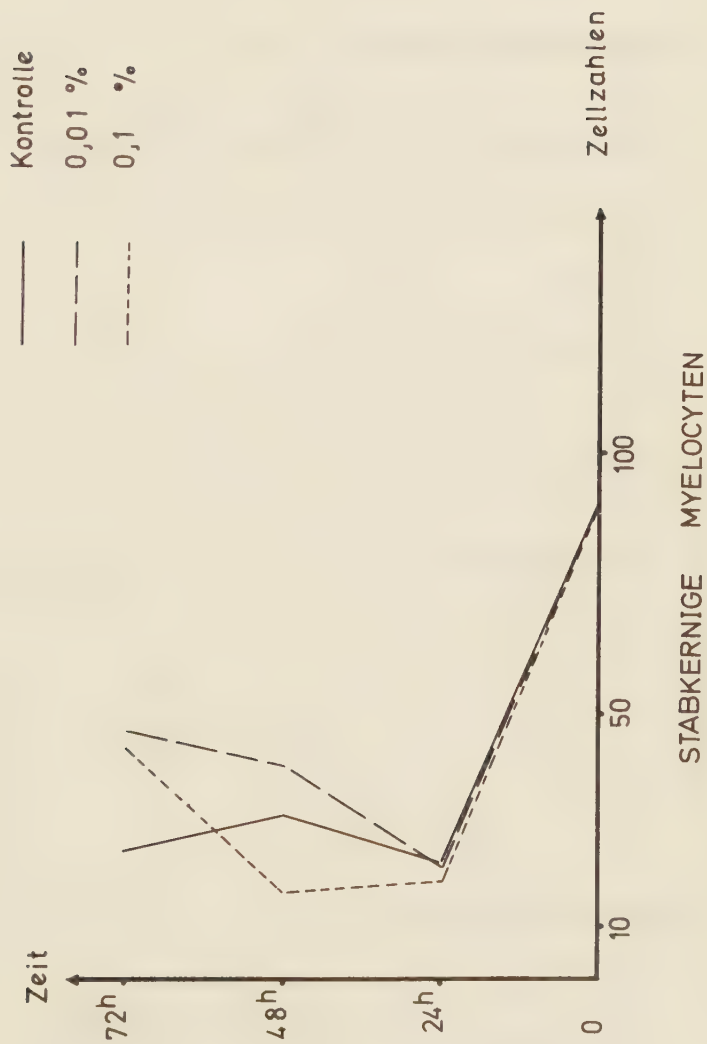
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte)

Kontrollkulturen		0,01 %	0,1 %	1 %	*
0^h	90,1				
24^h	22,0	21,4	18,3	20,0	
48^h	31,0	40,3	16,6	43,0	
72^h	24,6	47,4	44,0	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 16



10. Segmentkernige Granulocyten: (Abb. 17)

Die Kurven verhalten sich ähnlich. Vorhandene Abweichungen kommen bei 24^h am stärksten zum Ausdruck.

Die Unterschiede sind nicht signifikant.

$$F_v = 5,12 \quad F = 19,25$$

$$F_v < F$$

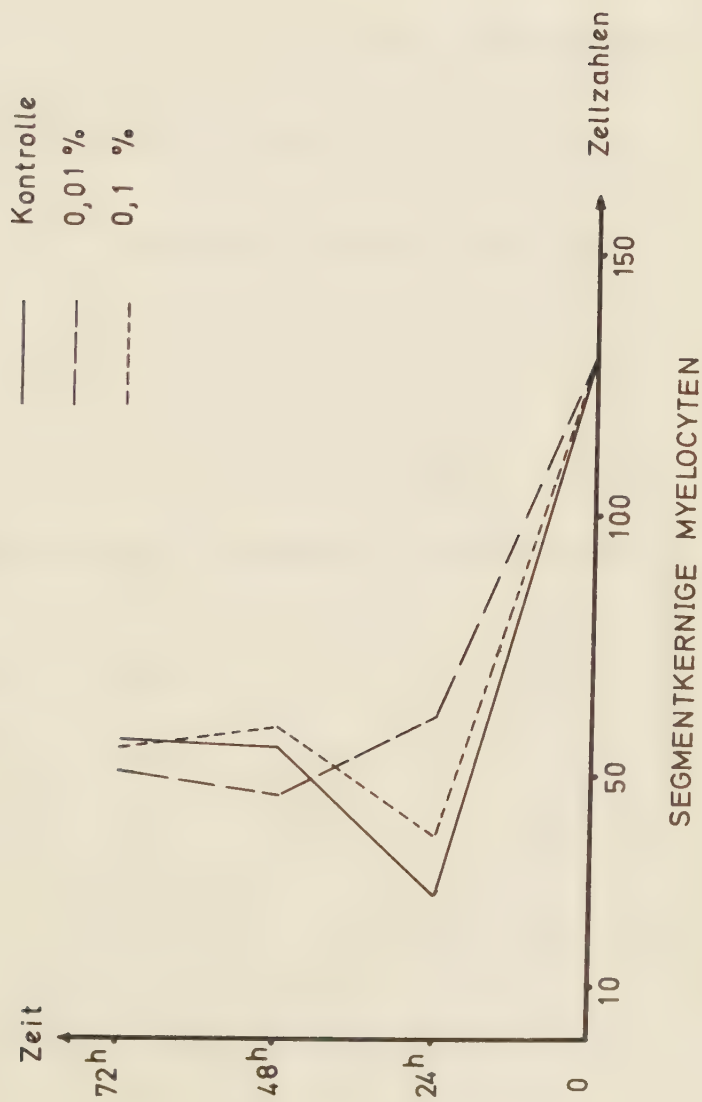
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	•
0 ^h	130,5				
24 ^h	27,5	61,7	38,7	124,5	
48 ^h	55,3	40,3	59,0	103,0	
72 ^h	56,7	50,4	55,0	--	

wenig auswertbares Material

Abb. 17



11. Lymphocyten: (Abb. 18)

Die Kurven entfernen sich bereits bei 24^h stark voneinander. Die Differenzen werden mit steigender Bebrütungs-
dauer noch deutlicher.

Grundsätzliche Unterschiede bestehen nicht.

$$F_v = 4,84 \quad F = 6,94$$

$$F_v < F$$

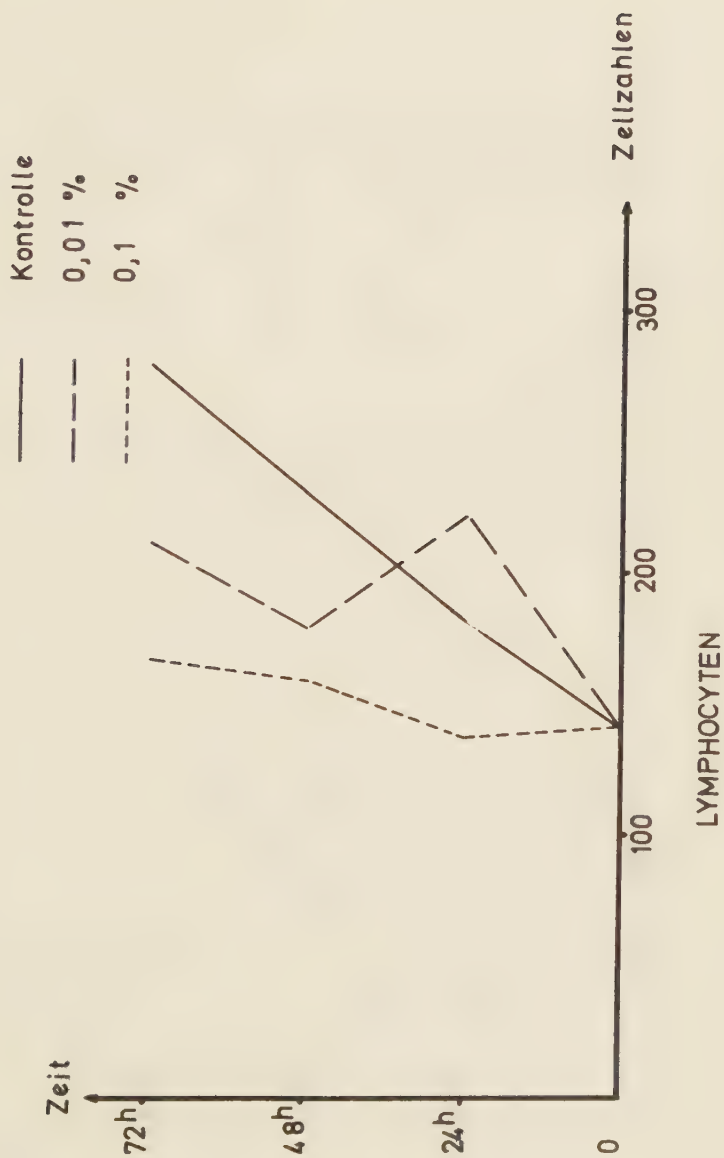
zm = zufällig

Zellzahlen (Mittelwerte)

	Kontrollkulturen	0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	141,5				
24 ^h	181,6	221,7	136,8	92,5	
48 ^h	226,9	178,7	158,4	175,0	
72 ^h	278,5	211,3	165,8	--	

wenig auswertbares Material

Abb. 18



12. Plasmazellen: (Abb. 19)

Die Kurve für 0,01% Zusatz verhält sich ähnlich der Kontrollkurve. Die Werte für 0,1% Zusatz fällt völlig aus dem Gesamtbild heraus.

Die Abweichungen sind nicht signifikant.

$$F_v = 1,39 \quad F = 19,25$$

$$F_v < F$$

zm = zufällig

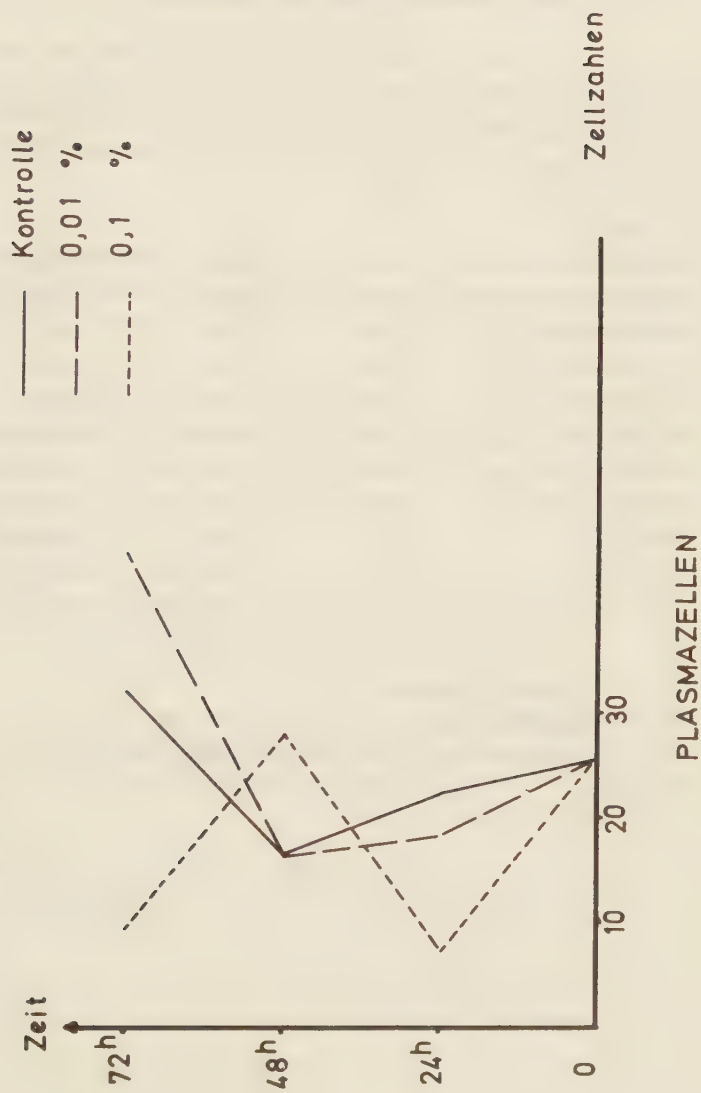
Die bei einer Patientin gezählten Plasmacytomzellen gingen in die Berechnung der Signifikanz nicht ein und sind auch nicht in den Zahlenangaben der Tabelle (Mittelwerte) enthalten.

Zellzahlen (Mittelwerte)

Kontrollkulturen		0,01 %	0,1 %	1 %	*
0 ^h	25,7				
24 ^h	21,8	18,2	7,2	4,0	
48 ^h	16,6	16,3	27,7	0	
72 ^h	32,1	45,0	9,4	--	

* wenig auswertbares Material

Abb. 19



Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse :

Zellart	F	Fv	zm
Proerythrobl.	6,94	2,23	zufällig
Basoph.Erythro- blasten	19,25	1,46	zufällig
Polychrom.			
Erythrobl.	6,94	2,98	zufällig
Reife Erythrocyten	6,94	3,09	zufällig
Myeloblasten	19,25	3,28	zufällig
Promyelocyten	19,25	5,10	zufällig
Myelocyten	6,94	2,91	zufällig
Metamyeloc.	6,94	1,31	zufällig
Stabk. Myeloc.	6,94	1,10	zufällig
Segmentk. My.	19,25	5,12	zufällig
Lymphocyten	6,94	4,84	zufällig
Plasmaz.	19,25	1,39	zufällig

F = geforderter Grenzwert

Fv = gefundener Wert

zm = Unterschied zwischen den Konzentrationen

zm = signifikant, wenn $F < Fv$

3. Es wurde weiterhin zu der Frage Stellung genommen, ob ein Einfluß von Penicillin und Dihydrostreptomycin auf die Mitosephasenverteilung besteht. In die graphische Darstellung gingen die absoluten Zahlen aller gefundenen Mitosen ein (Abb. 20 - 21)

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß alle 4 Kurven, die den 4 Versuchsreihen (Kontrolle, 0,01% Zusatz, 0,1% Zusatz, 1% Zusatz) entsprechen, ein gleichsinniges Verhalten zeigen :

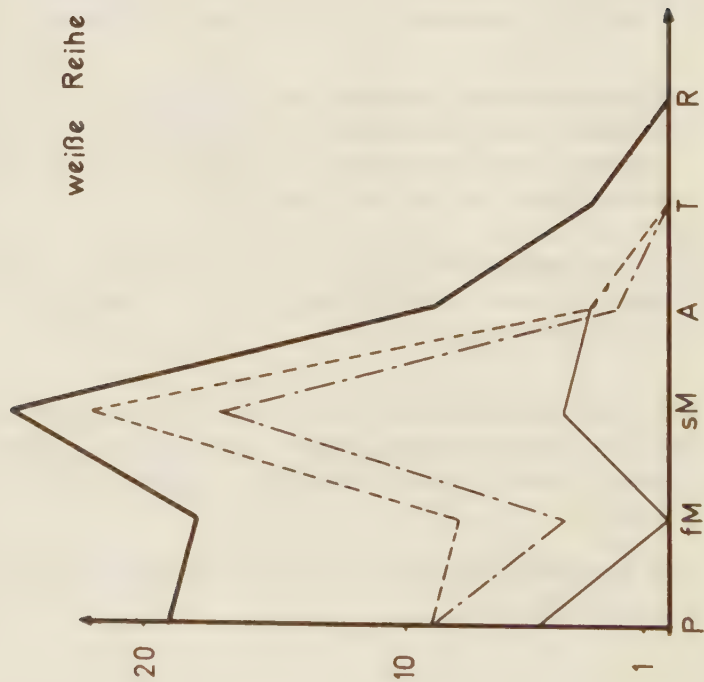
Nach einem mäßigen Abfall von den Prophasen zu den frühen Metaphasen liegt das Maximum aller Kurven bei den späten Metaphasen, um im weiteren Verlauf über Anaphasen und Telo-phasen schnell zur Nulllinie abzusinken.

Die beschriebene Bewegung ist bei den Kulturen mit 0,01% Zusatz und 0,1% Zusatz ausgeprägt und entspricht prinzipiell dem Charakter der Kontrollkurve.

Die Interpretation der Werte, die bei 1% Zusatz gefunden wurden, muß mit Vorsicht geschehen, da bei dieser Versuchsreihe, wie bereits erwähnt, nur wenig auswertbares Material zur Verfügung stand.

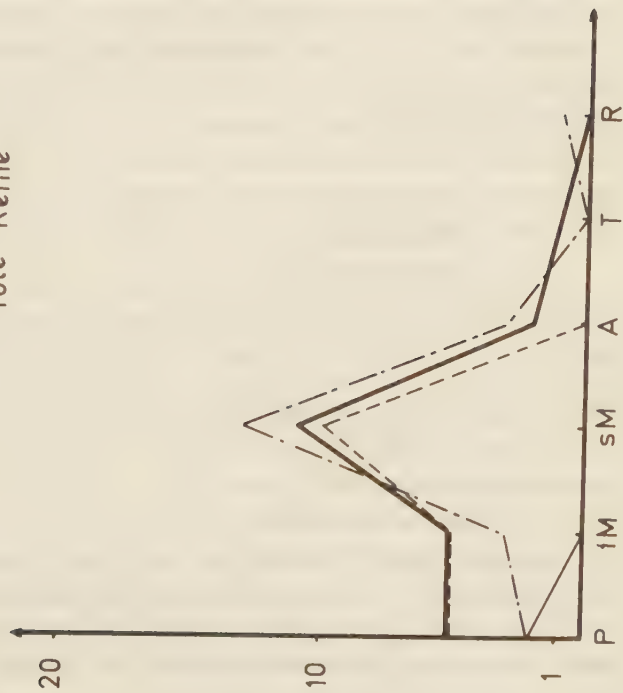
Ein Einfluß der beiden verwendeten Substanzen läßt sich auch hier nicht feststellen.

PHASENVERTEILUNGSKURVE



PHASENVERTEILUNGSKURVE

rote Reihe



Kontrolle
0,01 %
0,1 %
1,0 %

D i s k u s s i o n

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wird zu der aufgeworfenen Frage, ob der antibiotische Zusatz von Streptomycin und Penicillin die Proliferation des Knochenmarkes in vitro beeinflußt, wie folgt Stellung genommen :

Die Nützlichkeit der Anwendung von Antibiotika auf dem Gebiet der Gewebezüchtung ist unbestritten. Mit Recht warnte jedoch WILLMER (1965) vor dem kritiklosen Einsatz, indem er auf die biologische Aktivität dieser Stoffe hinwies und ihre Unschädlichkeit solange infrage stellte, bis sie durch geeignete Untersuchungen bewiesen sei.

Die in dieser Arbeit geprüften Substanzen

Penicillin

Dihydrostreptomycin

sind die in der Gewebezüchtung am häufigsten verwendeten Antibiotika.

Sie wurden untersucht hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellreifung

und der Beeinflussung der

Mitosehäufigkeit.

Die verwendeten Mengen von $10 \mu\text{g} / \text{ml}$, $100 \mu\text{g} / \text{ml}$, $1.000 \mu\text{g} / \text{ml}$ Dihydrostreptomycin bzw. $10 \text{ IE} / \text{ml} = 6 \mu\text{g} / \text{ml}$, $100 \text{ IE} / \text{ml} = 60 \mu\text{g} / \text{ml}$, $1.000 \text{ IE} / \text{ml} = 600 \mu\text{g} / \text{ml}$ Penicillin liegen über den für therapeutische Zwecke geforderten Serumkonzentrationen und schließen die im allgemeinen für die Gewebezüchtung empfohlenen Konzentrationen ein.

Als Beispiel seien die von RERABEK (1960) und von PAUL (1959) als geeignet angegebenen Mengen angeführt:

RERABEK: 100 - 500 IE Penicillin/ml
 100 - 500 μ g Streptomycin/ml

PAUL: 50 IE Penicillin/ml
 50 μ g Streptomycin/ml

Wir haben die Gemische in Versuchen an Knochenmark-Kurzkulturen von Menschen geprüft hinsichtlich ihrer Wirkung

a) auf ihre Reifung:

Grundsätzlich kann festgestellt werden, daß sich von den Kulturen ohne Zusatz bei den einzelnen Konzentrationen in den Reifungskurven keine signifikanten Abweichungen in den verschiedenen Zellzahlen fanden. Eine Hemmung bzw. Schädigung einzelner Zelltypen konnte also nicht beobachtet werden.

Dies muß mit einer gewissen Einschränkung gesagt werden. Entsprechend der Methodik, die dieser Arbeit zugrunde liegt, beschränkt sich die Feststellung einer Schädigung auf das Registrieren von Änderungen der Zellzahlen (in Prozent). Über mögliche Veränderungen, die im molekularen Bereich liegen, können im Rahmen dieser Arbeit ohnehin keine Aussagen gemacht werden. Betont werden kann aber, daß Änderungen der Zellmorphologie im Sinne einer Degeneration, wie z.B. Karyorhexis, Auflösung der Zellmembran, Blasenbildung des Protoplasmas, nicht auffällig häufiger bei den Kulturen mit Zusatz als bei den Kontrollkulturen beobachtet wurden.

b) auf die Regeneration:

Die festgestellten Änderungen der Mitosehäufigkeit unter Antibiotikaeinfluß waren nicht signifikant. Es fällt jedoch auf, daß die Werte bei den einzelnen Zusätzen im Mittel unter denen der Kontrollkulturen liegen, wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, und daß die Abnahme des Mitoseindex sowohl mit steigender Konzentration der zugesetzten Antibiotika wie auch in Abhängigkeit der Zeit der Bebrütung deutlicher wird. Diese Veränderung der Regeneration werden sowohl in der weißen als auch in der roten Reihe gefunden.

Von NEU, ASPILLAGA und GARDNER (1965) konnten entsprechende Beobachtungen gemacht werden:

Es wurde hier die Änderung der Mitoserate bei den Leukozyten - Kulturen (Phytokulturen) unter Streptomycin und Penicillin getrennt registriert. Während Streptomycin bei Konzentrationen von 500 μ g /ml offensichtlich die Mitoserate anhub, konnte bei gleichen Mengen ein gegensinniger Effekt durch Penicillin beobachtet werden. Die bereits von WILSON (1950) gefundene Stimulierung von Mitosen in Gewebe aus Zwiebelwurzeln unter bestimmten Penicillinkonzentrationen wurde von NEU ebenfalls beschrieben. Sie war aber so dezent, daß sie nicht ins Gewicht fiel.

Addiert man die beiden unterschiedlichen Effekte von Streptomycin und Penicillin, so ergibt sich keine besondere Wirksamkeit, was im Wesentlichen mit unserer Beobachtung übereinstimmt. Die von NEU (1965) nur auf Phytokulturen bezogenen Aussagen können nach unseren Ergebnissen auf alle teilungsfähigen Zellen des Knochenmarks angewendet werden; wenn auch die Wirkung auf die Zellen der roten Reihe deutlicher als in der weißen Reihe zu sein scheint.

Eine Schädigung von Kulturen aus menschlicher Haut wurden bei der Konzentration von

1 000 µg/ml Streptomycin

1 000 µg/ml Penicillin

(= 1 666 IE/ml)

durch Paul (1959) festgestellt und angegeben. Alle von uns geprüften Zusätze erwiesen sich als Mittel zur Verhütung von bakteriellen Verunreinigungen bei der Züchtung von Knochenmarkkulturen als anwendbar. Wir können deshalb als idealen Zusatz ein Gemisch empfehlen, das unserer 0,01 %igen Lösung entspricht.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß die Anwendung von Dihydrostreptomycin und Penicillin bei der Züchtung von Knochenmarkkulturen, auch wenn die beschriebenen Veränderungen der Mitoserate als nicht signifikant gefunden werden, nur bei niedrigen Konzentrationen (0,01 %ige Lösung) und bis zu einer Bebrütungsdauer bis 48 Stunden unbedenklich scheint.

Zusammenfassung

Es wurde die Verwendbarkeit von Dihydrostreptomycin und Penicillin als Antibiotika bei der Züchtung menschlicher Knochenmarkkulturen geprüft. Nach den vorliegenden Ergebnissen kommt es nicht zu einer signifikanten Änderung der Proliferationsaktivität.

Als idealer Zusatz kann ein Gemisch von

10 μ g/ml Dihydrostreptomycin
und 10 IE/ml
(= 6 μ g/ml) Penicillin

empfohlen werden.

Literaturverzeichnis

1. Albrecht, M. und J. von Riesen : Einführung in die Zelldiagnostik des menschlichen Knochenmarkes und Blutes
Walter de Gruyter, Berlin, 1957
2. Boll, I. und G. Fuchs : Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro
Blut VII, 257 (1961)
3. Boll, I. : Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro;
Granuloblastenmitosen
Folia haemat. 3,1,78 (1958)
4. Cohen, S. S. : I. Biol. Chem. 168, 511 (1947)
5. Lépine, P., G. Berski, J. Mawin : Action of chloromycetin and aureomycin on normal tissue cultures
Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 73, 252
(1950)
6. Metzger, J.E. - M.H. Fusilo - D.M. Kuhns : Effect of polymyxin and viomycin on embryonic cells in tissue cultures.
Antibiot. a. Chemother. 2,227 (1952)
7. Moskowitz, M. - N.E. Kelker : Sensitivity of cultured mammalian cells to streptomycin and dihydrostreptomycin
Science August 16, 1963, Vol. 141, 3581 pp. 647 - 648

8. Neu, R. - M.J. Aspiilaga -
L.I. Gardner : Effects of antibiotics on chromo-
somes of cultured human leucocytes
Nature, Vol. 205, No. 4967, pp.
171 - 172 January 9, 1965
9. Paul, J. : Cell and tissue culture. E. & S.
Livingstone LTD. Edinburgh and
London (1959)
10. Rérábek J. und E.Rérábek : Leitfaden der Gewebezüchtung. VEB
Gustav Fischer Verlag, Jena (1960)
11. Rohr, K : Das menschliche Knochenmark. Thieme,
Stuttgart (1960)
12. Willmer , E.N. : Cells and tissues in Culture
Academic Press, London, New York
(1965)
13. Wilson, G.B. : I. Hered, 41, 227 (1950)

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Irene Boll
schulde ich Dank für die freundliche
Unterstützung der Arbeit.

Lebenslauf

Ich wurde am 16. Juni 1940 als Tochter des Dipl. Ing. Wilhelm Dietsch in Zeulenroda/Thüringen geboren.

Ab 1946 besuchte ich die dortige Grundschule.

Aus politischen Gründen verließ unsere Familie 1952 Ostdeutschland und zog nach Berlin - Lankwitz. Nach einem Jahr Besuch der Volksschule wurde ich in die Beethoven-Schule in Berlin aufgenommen, der ich bis zu unserem Umzug nach Eschwege angehörte.

Ab Ostern 1957 bis zu meinem Abitur 1960 war ich Schülerin des Leuchtberg - Gymnasiums in Eschwege.

Nach einem Krankenpflegepraktikum im Städtischen Krankenhaus Nürnberg begann ich im Wintersemester 1960/61 mein Studium an der Universität Erlangen.

Nach dem Vorphysikum studierte ich an der Freien Universität Berlin und legte dort mein Staatsexamen ab.

Am 1. April 1967 stellte mich das Kreiskrankenhaus Helmstedt als Medizinalassistentin ein. Ich war dort acht Monate auf der Chirurgischen und fünf Monate auf der Gynäkologischen Abteilung tätig.

Seit dem 1. Juni 1968 arbeite ich am Städtischen Krankenhaus Am Kreuzberg, Berlin, auf der I. Inneren Abteilung.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.
Die Arbeit ist eine Arbeit über die Geschichte der
Wissenschaften in der Zeit von 1800 bis 1900.

